

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS.

Pour obtenir le Grade de Docteur ès-Sciences Physiques

par

SUNG Shou-Sin

1ère THESE : Etude énergétique de la thermodénaturation de deux
isohémagglutinines humaines.

2ème THESE :

Soutenues le 11 Janv. 1958 devant la Commission d'Examen

	<u>WURMSER</u>	Président
M.M.	<u>LEDERER</u>	
	<u>TONNELAT</u>	Examineurs

1958

- FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS -

P R O F E S S E U R S

Doyen J. PÉRÈS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure	GAUTHERET	T Biologie végétale (PCB)
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale	LUCAS	T Recherches physiques
PAUTHENIER	T Electrotechnique Générale	A. THOMAS	T Biologie cellulaire
DE BROGLIE	T Théories physiques	ARNULF	T Optique appliquée
PRENANT	T Anatomie et histol. comparées	M. MORAND	T Enseignement de physique
GARNIER	T Géom. supérieure	SOLEILLET	T Physique
PERES	T Mécanique des fluides et applications	FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides
LAUGIER	T Physiologie générale	DANJON	T Astronomie
M. CURIE	T Physique (S.P.C.N.)	LAPORTE	T Physique générale et radioactivité
BARRABE	T Géologie struct. et géologie appliquée	JANET	T Mécanique analytique et Mécan. céleste
G. DARMOIS	T Calcul des probabil.	PETIT	T Biologie maritime
BOURCART	T Géogr. physique et Géologie dynamique	QUENEY	T Météorologie et dynam. atmosphérique
PLANTEFOL	T Botanique	GALLIEN	T Embryologie
GRASSE	T Evolution des êtres organisés	EICHHORN	T Biologie Vég. (SPCN)
PREVOST	T Chimie organique	DE CUGNAC	T Biologie Vég. (SPCN)
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la géométrie	Mle CAUCHOIS	T Chimie physique
CHAUDRON	T Chimie appliquée	THELLIER	T Physique du Globe
WYART	T Minéralogie	L'HERITIER	T Génétique
TEISSIER	T Zoologie	GRIVET	T Radioélectricité
MANGENOT	T Biologie végétale	PONCIN	T Mécanique générale
P. AUGER	T Physique quantique et relativité	DUBREIL	T Arithm. et théorie des nombres
MONNIER	T Physiologie générale	QUELET	T Chimie organique
PIVETEAU	T Paléontologie	CAGNIARD	T Géophysique appliquée
ROCARD	T Physique (E.N.S.)	CHAMPETIER	T Chimie macromolécul.
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.)	CUVILLIER	T Micropaléontologie
LAFFITTE	T Chimie générale	JUNG	T Pétrographie
FAVARD	T Géométrie supérieure	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique
COULOMB	T Physique du Globe	WIEMANN	T Chimie organique et structurale
Mle COUSIN	T Biol. animale (SPCN)	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste
CHRETIEN	T Chimie minérale	VASSY	T Physique de l'atmosphère
P. DRACH	T Zoologie	DESTOUCHES	T Théories physiques
KASTLER	T Physique	PRUVOST	T Géologie
EPHRUSSI	T Génétique	AMIEL	T Chimie générale (PCB)
WURMSER	T Biologie physico-chimique	HOCART	T Minéralogie
RIVIERE	T Géologie (S.P.C.N.)	J.P. MATHIEU	T Physique (P.C.B.)

.../...

COUTEAUX	T Biol. animale (PCB)	LENORMANT	Physiologie
MAY	T Biol. animale (PCB)	Mme CHAIX	Chimie biologique
CHOQUET	T Calcul différentiel et intégral	Mme HUREL-PY	Biologie végétale (PCB)
FELDMANN	T Biologie (P.C.B.)	PIAUX	Chimie (P.C.B.)
GUINIER	T Physique des solides	BRUN	Mécanique expérimentale des fluides
JOST	T Physiologie comparée	LEDERER	T Chimie biologique
FORTET	T Calcul des probabil.	Mme DUBREIL	T Mathématiques
SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.	Mme LELONG	T Mathématiques (E.N.S.)
CHOUARD	T Physiologie végétale	BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.)
MALAVARD	T Aviation	COTTE	T Physique (M.P.C.)
BRELOT	T Calcul différentiel	DUBOIS J.E.	T Chimie (S.P.C.N.)
NORMANT	T Chimie organique	LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.)
BENARD	T Chimie (P.C.B.)	MICHEL	T Chimie (S.P.C.N.)
BUVAT	T Botanique (E.N.S.)	OLMER	T Energétique Générale
DUGUE	T Statistiques mathé- matiques	ROUAULT	T Physique Générale
GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.)	GAUTHIER	T Mécan. appliquée
SOULAIRAC	T Isochysiologie	BARCHEWITZ	Chimie physique
ULRICH	T Physiologie végétale	BROSSEL	Physique atomique
MARECHAL	T Optique théorique et appliquée	BUSER	Biol. animale (P.C.B.)
KIRRMANN	T Théories chimiques	CAMUS	Biol. vég. (P.C.B.)
CHADEFAUD	Botanique	CASTAING	Physique générale
DESTRIAU	T Physique (M.P.C.)	CURIEN	Minéralogie et cristal- lographie
Mlle LE BRETON	T Physiologie générale	MOYSE	Physiologie végétale
SALEM	T Mathématiques générales	NOIROT	Evolution des êtres organisés
LELONG	T Mathématiques générales	PANNETIER	Chimie (P.C.B.)
DEVILLERS	Anatomie et histologie comparées	POSSOMPES	Biologie animale (PCB)
EHRESMANN	T Topologie algébrique	PULLMANN	Chimie théorique
FRANCON	Physique (S.P.C.N.)	TEILLAC	Phys. nucléaire et Radioactivité
GLANGEAUD	T Géogr. physique et géologie dynamique	TONNELAT	Biologie physico- chimique
GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.)	VILLE	Econométrie
PISOT	T Calcul des Probabil.	WILLEMART	Chimie (P.C.B.)
ROCH	T Géologie	DODE	Chimie
SCHATZMANN	Astrophysique	FREYMAN	Physique (S.P.C.N.)
TERMIER	T Paléontologie strati- graphique	GUINOCHET	Biol. Végétale (Orsay)
ZAMANSKY	T Mathématiques générales	ROLLET	Chimie (P.C.B.)
LENNUIER	Physique (M.G.P.)	Mlle JOSIEN	Chimie (P.C.B.)
RIZET	Génétique	CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes
ROUTHIER	Géologie appliquée	DESNUELLE	T Chimie biologique
Mme TONNELAT	Théories physiques		
DIXMIER	Mathématiques (M.P.C.)		
SOUCHAY	Chimie générale		
AIGRAIN	Physique (P.C.B.)		
BRUSSET	Chimie minérale		
M. LEVY	Physique théorique		

SECRETAIRE GENERAL C. MONIER

Série A, N° 3367
N° d'ordre : 4519

THESES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS.

Pour obtenir le Grade de Docteur ès-Sciences Physiques

par

SUNG Shou-Sin

1ère THESE : Etude énergétique de la thermodénaturation de deux
isohémagglutinines humaines.

2ème THESE :

Soutenues le 11 Janv. 1958 devant la Commission d'Examen

Président

M.M.

Examineurs

WERNER

LEDERER

TONNELAT

129/2



INTRODUCTION

Le présent travail concerne l'étude énergétique de la thermodénaturation de deux des isohémagglutinines anti-B que l'on trouve dans les sérums humains et qui sont désignés par les symboles $\beta(A_{10})$ et $\beta(00)$. La question s'est trouvée posée à la suite de récents développements de nos connaissances sur ces substances.

Depuis la découverte des groupes sanguins par Landsteiner en 1900, on peut distinguer deux étapes dans ce domaine de recherches.

1° Etape d'études qualitatives - Landsteiner a découvert l'existence de groupes sanguins par de simples observations qualitatives. Leur subdivision en sous-groupes est due à des travaux du même genre, et c'est ainsi qu'ont été traités beaucoup de problèmes, aussi importants que ceux de la transfusion sanguine, de la recherche de paternité, de la transmissibilité héréditaire.

2° Etape d'études quantitatives - Pour aller plus loin, des études quantitatives étaient nécessaires. L'absence d'une méthode convenable de dosage d'agglutinine empêchait jusqu'à ces dernières années d'entreprendre de telles études.

Il existait bien une méthode classique dite de double dilution, qui consiste à diluer de moitié en moitié le sérum et à noter la plus

haute dilution correspondant à un seuil d'agglutination. Cette méthode, techniquement assez simple, est surtout utilisée en clinique et dans quelques laboratoires. Elle est absolument inadéquate pour répondre aux exigences des études quantitatives du phénomène d'hémagglutination, car elle manque non seulement de précision mais aussi de fidélité. Pour illustrer jusqu'à quel point va l'incertitude de cette technique, Kabat (1) cite que pendant la Deuxième Guerre Mondiale, le Conseil National Américain de la Recherche avait envoyé des échantillons d'un même sérum à dix laboratoires différents, afin d'en connaître la teneur en une agglutinine. Les réponses donnaient des titres variant de 40 à 2000.

La méthode de Heidelberger elle-même, qui repose sur un microdosage d'azote et qui a rendu de si grands services en immuno-chimie est, malgré sa haute sensibilité, encore insuffisante quand on est obligé de mesurer des concentrations d'agglutinine de l'ordre de 10^{-10} M, ce qui, nous le verrons, s'est avéré nécessaire.

L'introduction faite en 1947 par S. Filitti-Wurmser et Y. Jacquot-Armand (2) d'une méthode de dosage d'agglutinine par numération globulaire a comblé cette insuffisance et ouvert une ère d'études quantitatives de l'hémagglutination. On peut obtenir en effet par cette technique les concentrations de l'agglutinine en valeurs relatives à environ 5 % près. Le coefficient d'équivalence permettant la conversion en molarité a été ensuite déterminé par les mêmes auteurs par microdosage d'azote (3).

Munis ainsi de ce moyen de doser les faibles concentrations d'agglutinines, R. Wurmser et ses collaborateurs ont entrepris (2-12) depuis

dix ans l'étude thermodynamique de l'isohémagglutination. C'est ainsi qu'ils ont montré que l'isohémagglutination est un phénomène réversible comparable à cet égard à une réaction chimique ordinaire obéissant à la loi d'action de masse (5). La constante d'équilibre concernant quelques-uns des systèmes agglutinine-agglutinogène a été mesurée à plusieurs températures, d'où il a été possible de tirer les variations d'enthalpie

ΔH , d'entropie ΔS et d'énergie libre ΔF correspondant à la combinaison agglutinine-agglutinogène. En comparant ces données énergétiques, il est apparu que les isohémagglutinines qui réagissent spécifiquement avec un même agglutinogène, mais qui proviennent d'individus de génotypes différents, diffèrent entre elles par leurs propriétés thermodynamiques. Ce fait ne pouvant être expliqué en ne considérant que le groupe responsable de la combinaison spécifique, il fallait que des différences existent dans l'entourage du groupe ou dans l'ensemble de la protéine portant ce groupe. Effectivement, des mesures de vitesse de sédimentation par ultracentrifugation ont permis de trouver que les agglutinines en question sont dissemblables en ce qui concerne leurs dimensions moléculaires. Ainsi pour le groupe d'agglutinines anti-B qui nous intéresse, on a trouvé les poids moléculaires suivants : pour $\beta(A_1O)$ environ 500.000 ; pour $\beta(A_1A_1)$ environ 300.000 et pour $\beta(OO)$ environ 170.000. Un autre fait inattendu est que les molécules d'isohémagglutinines existant à l'état naturel dans le sérum se comportent toutes, à la précision expérimentale près, c'est-à-dire 10 %, de la même façon alors que les espèces moléculaires engendrées par immunisation sont hétérogènes.

Ces résultats, en particulier l'existence d'une molécule telle que $\beta(A_1O)$ ont une grande importance au point de vue de la synthèse protéique

et de son mécanisme génétique. Ils permettent aussi d'envisager une étude des forces intervenant dans l'union de l'agglutinine à l'agglutinogène par des mesures d'affinité sous diverses conditions, en particulier d'acidité et de force ionique.

Il était indiqué de voir si d'autres différences que celles déjà découvertes entre les diverses isohémagglutinines anti-B, affinité pour l'agglutinogène, dimensions moléculaires, pouvaient être mises en évidence. C'est dans cet esprit que nous avons entrepris le présent travail sur la thermodénaturation des isohémagglutinines $\beta(A_1O)$ et $\beta(OO)$. Il n'était pas possible d'obtenir des données énergétiques sur le processus total de la dénaturation parce que dans ce cas il n'est pas réversible. En effet, les ampoules de sérum chauffé et conservé au froid pendant plusieurs semaines donnent les mêmes résultats qu'immédiatement après le chauffage quand on dose leur concentration en agglutinine. Nous avons dû nous limiter à des déterminations de vitesse et à des mesures d'énergie d'activation. Mais les résultats s'encadrent bien dans les conceptions usuelles sur la dénaturation.

Rappelons que dans ce processus il peut y avoir rupture de plusieurs sortes de liaisons :

1° Les liaisons salines entre groupes COO^- et NH_3^+ des chaînes latérales d'acides aminés,

2° les liaisons homopolaires S-S,

3° les liaisons hydrogène et spécialement celles qui unissent les spires consécutives des hélices suivant lesquelles s'enroulent les chaînes principales. Selon Stearn (13), si l'on néglige les liaisons homopolaires, la rupture de ces liaisons nécessite en moyenne une énergie de 5000 calories

chacune. Quant à l'accroissement d'entropie correspondant à une rupture de liaison hydrogène, les calculs de Mirsky et Pauling (14) ont abouti à 12 unités. Stearn a calculé sur cette base et a trouvé que le nombre de liaisons rompues ne représente qu'une très petite fraction de liaisons existantes sur la molécule étudiée. En effet, suivant l'image hélicoïdale de la structure de protéine avancée par Pauling, Corey et Branson (15), il doit y avoir sur la chaîne principale d'une molécule de protéine environ autant de liaisons hydrogène qu'il y a de résidus d'acides aminés. Pour une molécule de protéine telle que l'hémoglobine dont le poids moléculaire est de 67.000, il doit y avoir au moins 600 liaisons hydrogène rien que sur sa chaîne principale. Or, l'énergie d'activation de la thermodénaturation de l'hémoglobine a été trouvée comme étant de l'ordre de 75.000 calories par mol. D'après ces calculs, le processus d'activation de la dénaturation n'a causé la rupture que de 15 liaisons. Des données récentes dues à Schelleman (16) tendent à rectifier les valeurs admises par Eyring et Stearn. Les expériences de Schelleman ont montré, en effet, que la chaleur de formation d'une liaison hydrogène peptidique sur des solutions d'urée n'est que de 1500 calories par mol. Nous ne savons pas dans quelle mesure les données de Schelleman sur l'urée peuvent être applicables aux cas des protéines. De toute façon elles ne modifieraient pas de façon essentielle la conclusion tirée des valeurs de Stearn. En outre il existe deux faits qui peuvent diminuer encore la proportion de liaisons rompues dans une dénaturation sur le nombre total de celles-ci.

1° Dans les valeurs expérimentales de l'énergie d'activation, il y a une partie qui doit être consacrée à l'ionisation de la molécule dans la solution où elle se trouve, à en juger par le fait que l'énergie d'acti-

vation varie fortement suivant le pH du milieu (voir tableau XVI).

2° A part les liaisons sur la chaîne principale, il existe encore plusieurs sortes de liaisons sur les chaînes latérales que l'activation peut également atteindre. Le nombre de liaisons intéressant les chaînes latérales est difficile à évaluer du fait que nous ignorons la structure exacte de la presque totalité des protéines.

Quels que soient les calculs admis, l'activation de la dénaturation n'atteindrait donc qu'un nombre fort restreint de liaisons.

Une image satisfaisante de ce qui se passe est que l'activation consiste dans l'attaque des extrémités de l'hélice qui constitue l'armature de la molécule, ainsi que l'admet Irving M. Klotz (17).

Une réserve doit être faite à la base de ces raisonnements. L'énergie d'activation ne représente pas nécessairement la somme des énergies de liaisons rompues pour préparer le collapsus de la molécule. Elle est en fait la différence entre les énergies des liaisons rompues et les énergies de liaisons qui peuvent aussi se former dans l'état activé.

Nous verrons toutefois que la théorie des attaques par bout de chaîne rend bien compte des résultats observés dans l'étude des isohémagglutinines anti-B les plus dissemblables, $\beta(A_1O)$ et $\beta(OO)$.

° ° ° °
° °

Le présent travail a été effectué dans le laboratoire de Biologie physicochimique de la Faculté des Sciences, sous la direction de Monsieur le Professeur René Wurmser, à qui nous exprimons notre plus profonde gratitude.

Nous remercions également Madame S. Filitti-Wurmser, qui s'est chargée de la tâche ingrate de nous initier à la technique de dosage de l'agglutinine utilisée dans ce travail, et pour les suggestions et critiques qu'elle a bien voulu nous apporter dans l'accomplissement de cette thèse.

D'autres personnalités nous ont rendu service à divers épisodes de notre carrière : le Professeur F. Joliot-Curie, qui nous a introduit au Centre National de la Recherche Scientifique, le Professeur L. Bugnard, notre parrain de recherches, et le Professeur J. Tréfouël, qui nous a offert une hospitalité de trois ans à l'Institut Pasteur. Il nous est agréable de leur adresser notre fidèle souvenir et notre affectueuse reconnaissance.

Enfin, nous sommes particulièrement sensible à la gentillesse de nos camarades de ce laboratoire, qui ont su créer une aimable atmosphère propice à notre travail.

o o o o
o o o

CHAPITRE PREMIER

LA TECHNIQUE DE DOSAGE DES AGGLUTININES PAR NUMERATION GLOBULAIRE

Dans l'accomplissement de notre étude cinétique de la thermodénaturation des isohémagglutinines, nous avons dû effectuer un nombre considérable de dosages d'agglutinine. Pour tous ces dosages, nous avons toujours employé la méthode de S. Filitti-Wurmser et Y. Jacquot-Armand. Nous commençons donc par décrire les divers aspects de cette technique.

I. GENERALITES.

S. Filitti-Wurmser et Y. Jacquot-Armand ont constaté en 1947 (2) que si l'on prépare une série de mélanges contenant chacun un même volume de sérum et un même volume de suspension d'hématies agglutinables par ce sérum, et cela à une température donnée, le nombre d'hématies agglutinées augmente d'abord presque linéairement avec la concentration de la suspension d'hématies, puis plus lentement et atteint finalement une sorte de palier. Si l'on varie la température à laquelle se fait l'hémagglutination, l'allure initiale de la courbe reste la même, mais le palier sera d'autant plus haut que la température est plus basse. La figure 1 montre les résultats obtenus par les auteurs dans l'agglutination des hématies du groupe B par un sérum anti-B non chauffé et donc non privé d'inhibiteur. Afin de pouvoir représenter sur un même graphique l'ensemble des mesures, on a porté en abscisses, au lieu des nombres, les logarithmes des nombres N_t d'hématies totales initialement présentes et en ordonnées les logarithmes des nombres N_a d'hématies

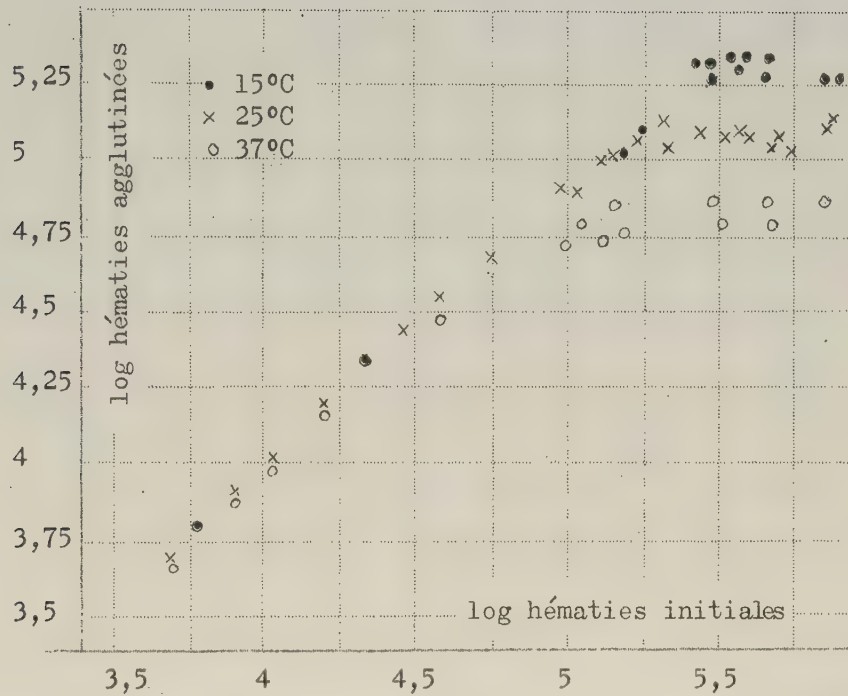


Figure 1.

Graphique emprunté à S.Filitti-Wurmser et Y.Jacquot-Armand (2) montrant la variation du nombre N_a d'hématies agglutinées en fonction du nombre total N_t d'hématies présentes.

agglutinées. Cette courbe à laquelle nous nous référerons souvent par la suite sera désignée sous le nom de courbe de référence.

Devant ce fait, il était naturel de penser que le nombre maximum d'hématies agglutinées par un sérum à une température donnée et dans des conditions expérimentales déterminées pouvait servir comme titre de ce sérum indiquant la concentration relative de l'agglutinine étudiée. On désignera par les symboles N_{θ} ces nombres maxima d'hématies agglutinées par mm^3 à la température θ . Le N_4 a été choisi conventionnellement pour exprimer la concentration en agglutinine d'un sérum, car le phénomène d'hémagglutination étant exothermique, on a intérêt à travailler à température aussi basse que possible, sans toutefois être trop près de la température de congélation.

La proportionnalité entre N_4 et la concentration ressort d'expériences faites sur un même sérum progressivement dilué. L'exemple ci-dessous est emprunté à Filitti-Wurmser, Jacquot-Armand et Wurmser (5) :

TABLEAU I

Dilutions	N_4	$N_4 \times \text{dilution}$
1 : 3	2.280.000	6.840.000
1 : 4	1.695.000	6.780.000
1 : 6	1.180.000	7.080.000
1 : 10	690.000	6.900.000

La proportionnalité a été vérifiée dans une zone plus étendue par Mavrides (18).

Il nous faut maintenant fixer les conditions expérimentales auxquelles on doit se placer pour effectuer un dosage correct.

a). Durée de la mise en équilibre.

Pour que l'expérience soit reproductible, on ne doit évidemment effectuer le comptage qu'après avoir atteint l'équilibre de l'héماغglutination. A cet effet, on mélange le sérum et la suspension d'hématies dans des ampoules que l'on scelle. Puis on agite ces ampoules, doucement dans des agitateurs placés à l'intérieur d'étuves ou de chambre froide. L'agitation a pour effet de permettre d'atteindre plus vite le point final de l'agglutination, de séparer de l'agglutinat les hématies qui y sont simplement enrobées et de maintenir toujours le mélange en suspension homogène. On a déterminé la durée nécessaire d'agitation en suivant la marche de l'agglutination pour chaque température d'expérimentation, c'est-à-dire en effectuant des comptages sur des ampoules contenant le même mélange, mais correspondant à différentes durées d'agitation. On a ainsi déterminé ces durées respectivement à 37°, 25° et 4°C ; ce sont 5 minutes à 37°, 20 minutes à 25° et 40 minutes à 4°C. En pratique, pour s'assurer une large marge de sécurité, et en tenant compte du temps nécessaire au mélange pour se mettre en équilibre thermique avec l'enceinte où il est placé, on agitera 30 minutes, 60 minutes et 120 minutes à 37°, 25° et 4° respectivement.

b). Détermination du palier de la courbe de référence.

Comme nous l'avons vu plus haut, le N_0 d'un sérum est, par définition, le nombre d'hématies agglutinées par mm^3 correspondant au palier de la courbe de référence. Lorsque l'on se trouve en présence d'un nouveau sérum, il n'est pas besoin de construire toute la courbe de référence. On peut, par tâtonnements, trouver deux valeurs de N_t qui donnent la même valeur de N_a . A partir de cette valeur de N_a et en tenant compte

de la dilution faite sur le sérum, on déduira la valeur de N_0 . En pratique, on peut également procéder avec un même N_t mais avec deux dilutions différentes du sérum.

II. TECHNIQUES.

a) Préparation du matériel biologique.

Le matériel biologique dont nous avons pu disposer provient du Centre Départemental de Transfusion Sanguine de Paris.

(1) Sérum : Il est obtenu à partir du sang de donneurs A et O prélevé stérilement et mis à coaguler à 2°C . Huit heures après le prélèvement, le caillot étant formé, le sérum est centrifugé stérilement à 2°C et, à l'aide d'une pipette Pasteur, réparti stérilement en ampoules scellées. Il est conservé gelé à -20°C . Au moment de son emploi, il est dégelé et chauffé pendant 50 minutes au bain-marie à 56°C . Cette dernière opération a pour objet de détruire un inhibiteur thermolabile de l'isohémagglutination existant dans le sérum en quantités variables suivant les individus. En ce qui concerne les sérums du groupe A, nous sélectionnerons ceux du génotype A_1O suivant une technique que nous décrirons ultérieurement.

(2) Hématies : Les hématies proviennent du sang de donneurs B recueilli stérilement dans un flacon contenant la solution anti-coagulante de

Wurmser (19) :	soude	1 g.
	ac. citrique	3 g.
	eau	100 g.
	sol. NaCl 8%	100 g.

On ajoute trois volumes de sang à deux volumes de la solution Wurmser.

Le sang est conservé à 2°C et utilisé pendant quatre jours. Au moment de l'expérience, on prélève le volume de sang nécessaire avec une serin-

gue dont l'aiguille stérile traverse le bouchon du flacon contenant le sang. Les hématies sont débarrassées du plasma par centrifugation, lavées deux fois avec une solution saline contenant 8 g. de NaCl par litre et ramenées au volume initial de sang prélevé, avec une solution tampon de pH 7,3 contenant pour 1 litre :

NaCl	8 g.
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	20,28 g.
KH ₂ PO ₄	1,35 g.

Cette solution tampon est utilisée pour effectuer les diverses dilutions de sérum et d'hématies nécessaires à l'étude expérimentale.

b) Conduite d'un dosage d'agglutinine.

On peut diviser l'opération en deux phases : une phase préparatoire et la numération proprement dite.

(1) Préparation : Dans chacune des six ampoules, on introduit 0,3 cm³ d'une suspension d'hématies ; dans trois d'entre elles, qui servent de témoin, on ajoute 0,6 cm³ de tampon et, dans les trois autres, que nous appellerons les préparations, on ajoute le même volume de sérum ou une dilution déterminée de celui-ci. Les ampoules de préparation sont ensuite scellées et agitées doucement à la température voulue. On évite une agitation trop brutale qui entraînerait l'hémolyse des hématies. On utilise pour cela des agitateurs à vitesse réglable portant un plateau horizontal où sont logées les ampoules. Ces agitateurs sont placés dans des étuves ou dans une chambre froide à 4°C selon la température à laquelle on veut étudier l'agglutination.

En pratique, on peut modifier suivant les circonstances et dans certaines limites les volumes de sérum et de suspension d'hématies, ou même les proportions réciproques de ces deux constituants du mélange, à la condition d'en tenir compte dans le calcul final pour déduire le N₀. Les

témoins les plus utilisés vont en général de 1.10^5 à 3.10^6 hématies par mm^3 du mélange.

Lorsque le temps de l'agitation, fixé à l'avance, est écoulé, les ampoules sont conservées à la même température que celle à laquelle a eu lieu l'hémagglutination en attendant la numération.

(2) Numération : Les mélanges ainsi préparés sont trop denses en hématies pour qu'on puisse distinguer celles-ci individuellement. Pour pouvoir les compter, il faut diluer encore le mélange 20, 50, 100 ou 200 fois dans une pipette hématimétrique. Dans la suite, nous appellerons cette dilution la dilution hématimétrique et nous la désignerons par la lettre D. On effectue cette dernière dilution à l'aide du tampon ordinaire conservé depuis au moins une heure à la température à laquelle a eu lieu l'agglutination dans les ampoules de préparation.

Après cette dilution, on dépose une goutte de la solution sur un hématimètre où sont gradués des carrés mesurant $1/25 \text{ mm}^2$. Le volume correspondant à un carré est, compte tenu d'un espace de $1/10 \text{ mm}$ entre l'hématimètre et la lamelle, de $1/250 \text{ mm}^3$. L'opération de numération elle-même peut s'effectuer soit directement sous le microscope, soit sur microphotographie de l'hématimètre. C'est ce dernier procédé que nous avons choisi. Dans les deux cas, on dispose d'un enregistreur électromagnétique qui marquera automatiquement une unité chaque fois que l'opérateur appuie sur la manette. On peut ainsi compter effectivement environ 20.000 hématies par jour sans trop de fatigue.

Pour les témoins, on comptera toutes les hématies se trouvant à l'intérieur d'un carré et celles qui chevauchent sur deux des quatre bords d'un carré. A la fin d'une numération, on notera le nombre x d'hématies

que l'on a comptées, et le nombre c de carrés qu'occupaient ces hématies.

Le nombre N_t par mm^3 est donc :

$$N_t = 250 D \cdot x / c$$

Pour les préparations, on comptera les hématies libres non engagées dans aucun des agglutinats de la même façon que précédemment. On obtiendra le nombre N_l :

$$N_l = 250 D \cdot x' / c'$$

d'où

$$N_a = N_t - N_l$$

Pour avoir le N_0 du sérum, il ne reste plus qu'à tenir compte de la dilution faite sur le sérum avant de réaliser le mélange sérum dilué - suspension d'hématies.

(3) Correction des agglutinats de coïncidence : La valeur de N_a ainsi obtenue comporte des incertitudes qui seront toutes passées en revue et dont les limites seront évaluées. Une place à part doit être faite à une des plus grandes causes d'erreurs, spécialement quand on opère microphotographiquement : il s'agit des agglutinats de coïncidence. Lorsque l'hémagglutination a eu lieu, on trouve dans le champ microscopique des agglutinats ayant diverses grosseurs allant du simple doublet jusqu'aux amas de 20 ou 30 hématies. Dans le dosage par détermination de N_4 , chaque hématie se trouvant impliquée dans un agglutinat de grosseur quelconque, représente le même nombre de molécules d'agglutinine. Or, même dans un témoin, c'est-à-dire dans une simple suspension d'hématies dépourvue d'aucune molécule d'agglutinine, on trouve aussi quelques doublets ou triplets constitués d'hématies se trouvant ensemble uniquement par coïncidence, et l'on n'a aucun moyen, quand on ne peut faire varier la mise au

point, de les distinguer de ceux unissant les hématies grâce à la fixation de molécules d'agglutinine. La quantité N_a que l'on vient d'obtenir est donc la somme de deux quantités : N_{av} , nombre d'hématies agglutinées vraiment par l'intermédiaire de molécules d'agglutinine et N_{ac} , nombre d'hématies se trouvant accolées par hasard. Le nombre N_θ dont il a été question tout à l'heure doit être déduit non pas de la quantité N_a mais plus exactement de la quantité N_{av} .

Pour nous rendre compte de l'importance de l'erreur que représentent ces petits amas de coïncidence, nous avons compté effectivement les hématies qui y sont engagées pour différents témoins. Voici ce que nous avons trouvé pour la dilution hématimétrique $D = 100$:

TABLEAU II

N_t en milliers	413	514	858	998	1280	1635	1810	2080
N_{ac} "	13	27	55	65	140	217	262	383

Nous voyons que la proportion de N_{ac} par rapport à N_t augmente rapidement lorsque celui-ci s'élève. Tandis que pour un témoin de 400.000, N_{ac} n'est que 3 %, celui-ci ne représentera pas moins de 18 % pour un témoin de 2.000.000. Or, pour se trouver sur le palier de la courbe de référence, condition indispensable pour que l'expérience soit reproductible, le taux d'agglutination $\tau = N_a/N_t$ est situé en général entre 20 % et 50 %. Par conséquent, si pour des témoins inférieurs à 500.000, la correction est inutile, au delà de cette valeur, elle est d'autant plus indispensable que le témoin est plus fort.

On a construit d'après les données ci-dessus la courbe de correction $N_{ac} = f(N_t)$. Cette courbe donne la quantité à ajouter à N_t pour obtenir N_a . Autrement dit, on se servira de la courbe de correction

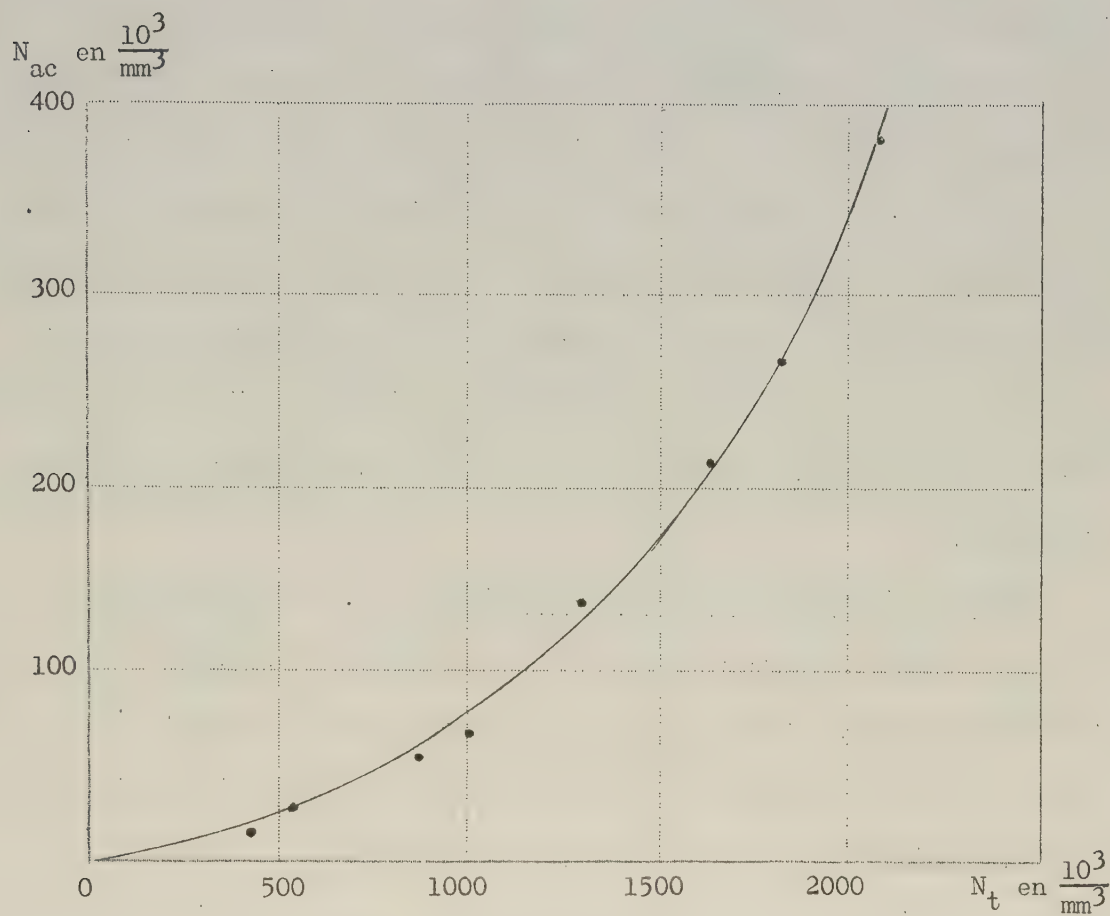


Figure 2.

Graphique montrant la variation du nombre N_{ac} d'hématies se trouvant accolées par coïncidence en fonction du nombre total N_t d'hématies que l'on étale sur l'hématimètre.

comme si elle était : $N_{ac} = f(N_1)$. Remarquons tout de suite que cette façon de procéder n'a pas la rigueur mathématique absolue ; on doit donc s'arranger pour que le terme correctif soit le plus petit possible : disons que le terme N_{ac} ne doit pas représenter plus que le $1/5$ du terme N_a . Remarquons également que si la courbe de correction était établie en rapportant N_{ac} et N_t au mm^3 , elle ne serait valable que pour la dilution hématimétrique D avec laquelle a été faite la conversion au mm^3 . Dans un autre dosage effectué avec une autre dilution hématimétrique D', on peut toujours se servir de la même courbe de correction en tenant compte du fait que le nombre d'hématies accolées par coïncidence est fonction de la densité réelle d'hématies se trouvant dans le champ du microscope.

Aspect théorique du problème de coïncidence. Ce problème a été traité par Irwin, Armitage et Davis (20) à propos du comptage des poussières de charbon. Ces auteurs ont spécifié que leur calcul n'est valable qu'à deux conditions : 1°) il faut que les particules soient à peu près sphériques ; 2°) il faut que leur diamètre ne soit pas trop différent. C'est bien le cas des hématies. Appelons r l'ordre de coïncidence, un amas d'ordre r est constitué par r particules. Toute particule sera touchée par $r-1$ autres particules si $r-1$ centres de particules se trouvent à l'intérieur du cercle ayant comme rayon le diamètre d de la particule. La probabilité P_r pour qu'une particule fasse partie d'un amas d'ordre r sera pour un nombre total N donné de particules :

$$P_r = \frac{m^{r-1} e^{-m}}{(r-1)!}$$

où $m = N\pi d^2/A$, A étant la surface dans laquelle les N particules se sont disposées par hasard.

D'où le nombre total N_{ac} de particules accolées sera :

$$N_{ac} = N \sum_{r=2}^{r=N} \frac{m^{r-1} e^{-m}}{(r-1)!}$$

avec

$$m = N\pi d^2/A$$

Calculons la valeur du terme m dans nos conditions de numération.

A étant la surface d'un carré hématimétrique vaut $1/25 \text{ mm}^2$ soit $4 \cdot 10^4 \mu^2$.

Admettons que le diamètre d d'une hématie soit de 7μ . D'où

$$m = N\pi d^2/A = 160 N/4 \cdot 10^4 = 4 \cdot 10^{-3} N$$

Si N est égal à 10^6 par mm^3 soit 40 par carré, on a $m = 0,16$.

Dans ces conditions, il est facile de voir que la chance de formation de quadruplets est de l'ordre de $1/1000$ donc pratiquement négligeable. Par conséquent, N_{ac} est essentiellement composé de deux termes seulement représentés respectivement par des doublets et des triplets. En supprimant tous les termes de m dont la puissance est égale ou supérieure à 3, on a :

$$N_{ac} = N^2 \pi d^2/A - \frac{1}{2} N^3 \pi^2 d^4/A^2$$

Il en ressort que le second terme est un terme correctif et vaut 8 % du premier. Par conséquent, la courbe $N_{ac} = f(N)$ est, à 8 % près, une courbe parabolique. Autrement dit, la courbe $N_{ac} = f(N^2)$ est à peu près une droite.

c) Exemple numérique :

Un exemple numérique rendra plus explicite le mode opératoire.

Nous avons à déterminer le N_4^* du sérum n° 21.2.56. Pour cela, on avait préparé un témoin contenant $0,4 \text{ cm}^3$ de solution tampon + $0,4 \text{ cm}^3$ de suspension d'hématies. Après numération, on trouve :

$$N_t = 1.004.000 \text{ par mm}^3.$$

Les ampoules de préparation sont réparties en deux lots. Le premier lot est composé de deux ampoules. On introduit dans chacune d'elles $0,4 \text{ cm}^3$ de sérum dilué 7 fois + $0,4 \text{ cm}^3$ de la même suspension d'hématies. Après agitation à 4°C pendant 2 heures, on compte les hématies restées libres. On trouve :

$$N_1 = 499.000 \text{ par mm}^3.$$

On a alors : $N_a = N_t - N_1 = 1.004.000 - 499.000 = 505.000 \text{ par mm}^3$. On lit sur la courbe de correction l'ordonnée correspondant à l'abscisse 499.000, soit 19.000. On a donc :

$$N_{av} = N_a - N_{ac} = 505.000 - 19.000 = 486.000 \text{ par mm}^3.$$

Pour avoir le N_4^* , on tient compte de ce que le sérum a été dilué 7 fois, par du tampon et 2 fois par le volume de suspension d'hématies. On doit donc multiplier N_{av} par 14.

$$N_4^* = 14 \times 486.000 = 6.804.000 \text{ par mm}^3.$$

On marque une astérisque sur le N_4^* pour spécifier qu'on a tenu compte de la dilution causée par la suspension d'hématies.

Dans le second lot d'ampoules qui sont au nombre de trois, on a mis $0,4 \text{ cm}^3$ de sérum dilué 10 fois + $0,4 \text{ cm}^3$ de suspension d'hématies à 50 %. Après la même durée d'agitation à 4°C , on compte les hématies restées libres, comme tout à l'heure, on trouve :

$$N_1 = 631.000 \text{ par mm}^3$$

On a alors : $N_a = N_t - N_1 = 1.004.000 - 631.000 = 373.000 \text{ par mm}^3$.

Sur la courbe de correction, on trouve que N_{ac} correspondant à un N_1 de 631.000 est de 32.000. D'où :

$$N_{av} = N_a - N_{ac} = 373.000 - 32.000 = 341.000 \text{ par mm}^3.$$

Pour des raisons qu'on vient d'expliquer, on fait, pour obtenir le N_4^* , une multiplication par 20 sur la valeur de N_{av} ainsi obtenue :

$$N_4^* = 20 \times 341.000 = 6.820.000 \text{ par mm}^3.$$

La presque identité de ces résultats assure qu'on se trouve bien sur le palier de la courbe de référence.

III . DISCUSSION SUR LA PRECISION.

Nous allons passer en revue les causes d'erreur possibles. Tout d'abord il faut tenir compte du fait que la numération se pratique à la température de la pièce, c'est-à-dire à une température qui n'est pas toujours celle à laquelle a eu lieu l'hémagglutination. Or, on sait, d'après les premiers travaux de S. Filitti-Wurmser et Y. Jacquot-Armand, que l'hémagglutination est une réaction d'équilibre obéissant à la loi d'action de masse. Le fait de changer soit la température soit la dilution du mélange avant d'enregistrer le résultat est susceptible de provoquer un déplacement d'équilibre. Mais en pratique, on a établi que ce déplacement éventuel n'a pas le temps d'avoir lieu pendant la numération ; évidemment la numération des ampoules de préparation doit s'effectuer aussi vite que possible.

Les autres causes d'erreurs peuvent être classées en trois catégories :

a) Causes d'erreurs provenant des hématies.

Doser l'agglutinine par numération des hématies, c'est considérer ces dernières comme une sorte d'étalon. Or, la teneur des hématies en agglu-

tinogène est certainement distribuée autour d'une valeur moyenne. L'idéal serait de se servir toujours des hématies d'un même individu, mais cela est matériellement impossible. Il ne semble pas toutefois que des erreurs notables puissent provenir de ce fait. Ceci résulte des mesures d'un même sérum faites avec les hématies de plusieurs donneurs (S. Filitti-Wurmser et Y. Jacquot-Armand, 1947).

Par contre, les erreurs dues à la diminution de résistance globale en fonction du temps doivent être soigneusement évitées. Nous pouvons donner deux exemples de cette diminution de résistance portant sur quatre séries de dosages :

TABLEAU III

Nombre de jours après prélèvement des hématies B	N ₄ du sérum	N ₄ du sérum
	n° 25.1.55 L	n° 25.1.55 M
10	2.460.000	2.148.000
	2.352.000	2.184.000
Hématies B d'un autre donneur :		
0	3.500.000	3.235.000
	3.140.000	
1	3.152.000	2.960.000
		2.394.000
2	3.171.000	2.484.000
	3.368.000	2.576.000

TABLEAU IV

Nombre de jours après prélèvement des hématies B	N ₄ du sérum n° 20.9.55 G	N ₄ du sérum n° 20.9.55 H
12	3.872.000 3.808.000	2.862.000 2.928.000
Hématies B d'un autre donneur :		
0	4.842.000 5.544.000	3.668.000 4.080.000
1	5.016.000 4.980.000	3.955.000 4.230.000
2	6.040.000 6.045.000	5.040.000 4.800.000
3	5.110.000 5.532.000	4.329.000 4.020.000
4	5.420.000 5.317.000	

De ces deux tableaux, il ressort que si les dosages effectués avec des hématies de 0-4 jours ne donnent pas des résultats très différents, le fait d'utiliser des hématies de 10-12 jours entraîne une diminution appréciable du N₄. La raison de cette diminution est que la membrane des hématies n'est pas lisse et pénètre irrégulièrement à l'intérieur de la cellule. Il peut donc résulter de l'hémolyse une augmentation du nombre de groupes agglutinogènes accessibles.

b) Causes d'erreurs d'origine opérationnelle.

Ces causes d'erreurs sont :

- (1) La constance de température de la chambre froide et des étuves dans lesquelles a lieu l'héماغglutination. Elles sont réglées à $\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- (2) Les erreurs d'opérations de dilution de sérum, de suspension d'hématies.
- (3) Les erreurs de prises de pipette, le remplissage des ampoules, l'étalement sur l'hématimètre, etc.

c) Causes d'erreurs d'origine statistique.

Le fait d'effectuer un petit prélèvement et d'attribuer la densité de cet échantillon au reste de la population comporte évidemment une inaptitude. Dans le cas présent, l'erreur théorique sur l'échantillonnage est la racine carrée du nombre N d'hématies comptées.

Erreur réelle dans les opérations de comptage -

Le rapport s de la variance des résultats au carré de l'erreur théorique a été calculé par S. Filitti-Wurmser et Y. Jacquot-Armand

(2) sur 21 mesures homologues. Il est de 1,3.

L'écart ^{erreur} type $\frac{N_t}{N_t} \left(\frac{\Delta N_t}{N_t} + \frac{\Delta N_t}{N_t} \right)$ sur le taux d'agglutination a été mesuré par ces auteurs pour des taux d'agglutination variant de 0,99 à 0,09. Les résultats montrent bien la nécessité d'opérer la numération des hématies libres dans le mélange agglutiné en prenant un plus grand nombre d'échantillons que pour la mesure des témoins. C'est pourquoi la technique généralement adoptée consiste à compter environ 4.000 hématies sur 6 hématimètres pour ces témoins, tandis que pour les hématies libres, on pratique des lectures sur 8 à 12 hématimètres, de

manière à compter finalement environ 4.000 hématies libres.

Dans ces conditions, l'écart type sur la moyenne de 7 mesures de N_4 est par exemple de 5 p.100 (J. Chim. Phys. 1952).

On remarquera que l'on peut écrire pour l'erreur relative sur le nombre des hématies agglutinées la relation

$$\frac{\Delta N_a}{N_a} = \frac{1}{\tau} \left[\frac{\Delta N_t}{N_t} + \frac{\Delta N_\theta}{N_\theta} (1-\tau) \right]$$

Cette relation met en évidence que plus τ est grand, plus l'erreur relative sur le nombre d'hématies agglutinées est petite. Il n'existe pas de τ optimum.

En résumé, pour réduire les erreurs statistiques, on doit utiliser un taux d'agglutination le plus élevé possible compatible avec les considérations découlant de la courbe de référence et compter le plus possible d'hématies pour mesurer N_t et N_1 . Mais à un moment donné, le fait de compter davantage d'hématies n'augmente plus la précision. C'est qu'à ce moment l'erreur statistique devient moins importante que l'erreur d'ordre opérationnel. Celle-ci doit être réduite en faisant la moyenne des résultats de plusieurs dosages du même genre. Enfin, pour réduire les erreurs causées par les variations de résistance globulaire des hématies, on évitera de se servir des hématies conservées depuis plus de 4 jours. Pour comparer deux sérums dont le N_θ est assez voisin, on effectuera le dosage le même jour avec le même témoin.

Avec toutes ces précautions, on arrive à obtenir une précision de 5 p. 100 sur le résultat final si l'on déduit celui-ci en faisant la moyenne des résultats de plusieurs dosages.

CHAPITRE II

CARACTÉRISATION DES ISOHEMAGGLUTININES

Nous avons indiqué dans l'introduction que les diverses hémagglutinines anti-B se distinguent par leurs propriétés thermodynamiques. En ce qui concerne l'isohémagglutinine $\beta(00)$, son identification ne présente pas de difficulté puisque le génotype d'un donneur de sang O est obtenu par les méthodes habituelles de reconnaissance des groupes sanguins.

Le problème se pose en ce qui concerne les isohémagglutinines $\beta(A_1O)$ qui doivent être distinguées des isohémagglutinines $\beta(A_1A_1)$ par des mesures d'affinité pour l'agglutinogène B.

Le procédé que nous employons est dû à S. Filitti-Wurmser, Y. Jacquot-Armand et R. Wurmser (5). En appliquant la théorie de combinaison multiple dissociable et en considérant l'hématic comme une molécule multifonctionnelle se combinant avec un nombre de molécules d'agglutinine variable suivant la concentration de celle-ci, les auteurs arrivent à une expression qui traduit l'affinité entre l'agglutinine et l'agglutinogène. Dans ces calculs, on admet qu'il n'y a pas d'interaction entre les groupes agglutinogènes qui sont suffisamment éloignés les uns des autres à la surface des hématies. Cela est d'autant plus vraisemblable que l'on s'écarte davantage de la zone de saturation, en raison des dimensions des molécules d'agglutinine. Il s'introduit alors

une simplification dans la loi des combinaisons multiples quand tous les groupes réactifs sont statistiquement indépendants.

Soit G un groupe agglutinogène et A une molécule d'agglutinine considérée comme unifonctionnelle. Cette dernière supposition est légitime car si des molécules d'agglutinine forment des ponts entre des groupes agglutinogènes appartenant à deux hématies différentes, ce ne peut être, pour des raisons stériques, qu'une fraction minime des molécules fixées.

Soit K la constante intrinsèque de l'association de A avec G. Cette constante supposée la même pour tous les m groupes agglutinogènes présents à la surface d'une hématie, est égale à la constante d'équilibre classique correspondant à la fixation d'une molécule d'agglutinine sur des hématies déjà à demi saturées.

Les notations suivantes sont employées :

N'_4 nombre maximum d'hématies agglutinées par mm^3 à 4°C par l'agglutinine restée libre en solution après une première agglutination effectuée à 37° , 25° ou 4°C .

N_f différence $N_4 - N'_4$, proportionnelle à l'agglutinine fixée par la totalité des hématies N_t .

h concentration en mole par litre de la totalité des hématies présentes dans le mélange (sérum + suspension d'hématies).

$(A)_f$ concentration en mole par litre de l'agglutinine fixée.

(A) concentration en mole par litre de l'agglutinine libre dans le mélange en équilibre.

γ facteur de proportionnalité de N_4 et N'_4 à la concentration molaire de l'agglutinine.

On a :

$$\frac{h}{(A)_f} = \frac{1}{m} + \frac{1}{mK(A)}$$

La pente de la droite représentant les variations de $h/(A)f$, en fonction de $1/(A)$ est inversement proportionnelle à K . En effet, m , nombre de groupes agglutinogènes accessibles d'une hématie, est une constante et il a été montré qu'elle ne varie pas avec la température.

Exprimons la dernière relation. Nous avons :

$$h = \frac{N_t \cdot 10^6}{6 \cdot 10^{23}}$$

$$N_f = N_4 - N'_4 = \varphi(A)f$$

$$N'_4 = \varphi(A)$$

d'où

$$\frac{N_t}{N_f} = \frac{6 \cdot 10^{17}}{m \varphi} + \frac{6 \cdot 10^{17}}{mK N'_4}$$

Dans le second membre de cette relation, le premier terme représente le $1/10$ à $1/100$ du second, si bien qu'avec l'échelle ordinaire, la droite représentative passe pratiquement par l'origine. La pente de cette droite qui est, répétons-le, inversement proportionnelle à la constante intrinsèque d'association K , donc à l'inverse de l'affinité agglutinine-agglutinogène, est pratiquement mesurée par la quantité $N_t \cdot N'_4 / N_f$.

Toutes ces quantités, N_t , N'_4 et N_f , sont facilement accessibles expérimentalement. Nous déterminons N_t à l'aide de la technique de numération globulaire précédemment décrite : c'est le nombre total d'hématies par mm^3 . Nous déterminons aussi N'_4 : ayant mis en présence agglutinine et hématies à une certaine température, lorsque l'équilibre d'agglutination est atteint, il reste une certaine concentration d'ag-

glutinine libre en solution. Pour ne pas déplacer l'équilibre, on centrifuge le mélange à la température de la réaction. L'agglutinine libre, c'est-à-dire non fixée par les groupes agglutinogènes des hématies, reste dans le liquide surnageant. On la détermine en valeur relative ainsi qu'il a été exposé dans le dosage d'agglutinine : on désigne par N'_4 le nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C par le surnageant. Dans la détermination de N'_4 , il est nécessaire de tenir compte de la dilution du sérum surnageant par la suspension d'hématies utilisées pour le dosage. Enfin, connaissant la concentration initiale de l'agglutinine, soit N_4 , et la concentration de l'agglutinine libre lorsque l'équilibre d'agglutination à une température donnée est atteint, soit N'_4 , on en déduit la concentration de l'agglutinine fixée par la totalité des hématies N_t , soit :

$$N_f = N_4 - N'_4$$

Voici pour différents sérums du groupe A les valeurs du produit

$(N_t/N_f)N'_4$, données que nous empruntons à S. Filitti-Wurmser,

Y. Jacquot-Armand et R. Wurmser (5) :

TABLEAU V

Sous-groupes sérums	$N_4 \times 10^{-3}$	$(N_t/N_f)/N'_4 \times 10^{-5}$	
		à 37°C	à 25°C
A_1^0	600	$1,53 \pm 0,10$	
	980		$0,53 \pm 0,06$
	1.000	$1,44 \pm 0,08$	$0,49 \pm 0,06$
	1.250	$1,45 \pm 0,11$	$0,41 \pm 0,08$
	1.254	$1,55 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,03$
	1.680	$1,55 \pm 0,06$	
	2.500		$0,51 \pm 0,05$
	3.770		$0,49 \pm 0,03$
A_1A_1	1.680	$1,94 \pm 0,11$	$1,36 \pm 0,12$
	2.300		
A_2	1.600		$0,25 \pm 0,02$
	1.850	$0,50 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,02$
	2.000	$0,46 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,02$
A_3	1.100	$2,60 \pm 0,33$	$2,60 \pm 0,30$

Il ressort de l'examen de ces chiffres que la valeur du $(N_t/N_f)/N'_4$ est indépendante de la teneur en agglutinine des sérums : N_4 variant de 600.000 à 3.770.000, et qu'elle conduit bien à un classement de ces sérums. Cette grandeur permet donc de caractériser à l'intérieur du groupe A et même du sous-groupe A_1 de nouvelles espèces d'agglutinines.

Rappelons que toutes les mesures doivent être effectuées sur les sérums préalablement chauffés à 56°C pendant 50 minutes, afin de détruire un inhibiteur thermolabile qui s'y trouve en quantité variable.

CHAPITRE III

ETUDE CINÉTIQUE DE LA THERMODÉNATURATION DES ISOHEMAGGLUTININES

Pour obtenir l'énergie d'activation expérimentale E ainsi que toutes les autres données énergétiques, variations d'enthalpie, d'énergie libre et d'entropie ΔH^* , ΔF^* et ΔS^* concernant l'activation du processus de dénaturation, il faut déterminer la constante de vitesse spécifique k à plusieurs températures. La dénaturation, en particulier par la chaleur, est considérée généralement comme une réaction du premier ordre. La cinétique d'une telle réaction a pour expression :

$$\ln N = \ln N_0 - kt$$

Si l'on construit un graphique en portant en ordonnées les logarithmes de concentrations N de la substance et en abscisses le temps t , on obtient une droite dont la pente mesurera la constante de vitesse k . Ayant ainsi obtenu les valeurs de k à plusieurs températures, on construit un autre graphique en portant cette fois en ordonnées les logarithmes de k et en abscisses l'inverse de la température absolue $1/T$. D'après la relation d'Arrhenius $\ln k = a - E/RT$, la pente de cette deuxième droite est égale à E/R .

a) Choix des températures et des durées de chauffage.

Nous devons choisir quelques températures auxquelles nous faisons subir la dénaturation de l'agglutinine à étudier. Et pour chaque température, nous avons à fixer quelques durées de chauffage à la suite

desquelles nous effectuerons des dosages d'agglutinine.

Il y a évidemment avantage à opérer à des températures aussi différentes que possible, mais il faut tenir compte du phénomène de gélification du sérum qui empêcherait d'effectuer les dosages d'agglutinine.

Lorsque l'on soumet un sérum à l'action continue de la chaleur, sa viscosité subit des modifications continues, elle augmente lorsque la température de chauffage est au-dessus de 56°C (21); puis, si le chauffage est prolongé, à un moment donné il y a apparition de la gélification.

Nous avons fixé en principe les durées de chauffage comme suit :

58°C	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.
60°C	15 min.	30 min.	45 min.	60 min.	
62°C	6 min.	12 min.	18 min.	24 min.	
64°C	2 min.	4 min.	6 min.	8 min.	

Nous avons effectué quelques mesures de viscosité à l'aide de l'appareil d'Ostwald. Les résultats se résument dans le tableau suivant :

TABLEAU VI

Viscosité absolue à 20°C en centipoises. Sérums n° 9.7.56 et 20.9.55, dilués 1/2 avec du tampon phosphate.

Température et durée de chauffage		Viscosité en centipoises	Moyenne
56°C	50 min.	1,352 1,360	1,356 $\pm$ 0,004
58°C	5 h.	1,617 1,639	1,628 $\pm$ 0,011
60°C	1 h.	1,531 1,536	1,534 $\pm$ 0,003

Or, on sait que pour un sérum humain normal non chauffé, la viscosité relative oscille entre 1,675 et 2,06. Rohrer (22) a obtenu, sur huit sérums qu'il a étudiés, la moyenne de 1,863, ce qui revient à 1,872 centipoises pour 20°C. Nous avons effectué une mesure de viscosité sur le sérum n° 9.7.56 non chauffé et nous avons trouvé 1,832 centipoises à 20°C.

D'autre part, des mesures de viscosité effectuées sur des sérums non chauffés mais dilués 1/2 ont donné $1,305 \pm 0,004$ centipoises à 20°C.

On constate donc que les modifications de viscosité résultant du chauffage au cours de nos expériences n'excède pas, en importance, les variations de viscosité que l'on rencontre dans les sérums normaux non chauffés et non dilués.

b) Conditions expérimentales.

Le pH est celui du sérum, c'est-à-dire pH 7,3-7,4. Le chauffage des sérums s'effectue dans un thermostat réglé à $\pm 0,1$ °C. Après avoir laissé l'ampoule de sérum à étudier prendre doucement la température de la pièce, on la plonge dans le thermostat en même temps qu'on déclenche un chronomètre. L'ampoule est maintenue dans le thermostat par de simples fils de fer pour qu'il n'y ait pas d'effet de paroi. Elle est sortie à l'expiration de sa durée de chauffage et est posée sur la table pour un refroidissement progressif. Ceci est très important, car en plongeant l'ampoule dans le thermostat, la température du contenu de l'ampoule ne sera pas portée immédiatement à celle du thermostat ; le laps de temps que met l'ampoule pour atteindre la température du thermostat sera compensé par le laps de temps que met l'ampoule pour reve-

nir à la température ambiante. Après la sortie du thermostat, la dénaturation thermique des agglutinines étant irréversible, on n'a qu'à conserver l'ampoule au froid pour les dosages ultérieurs.

c) Précision escomptée des résultats.

1. Précision sur les valeurs de k. Nous faisons le calcul en supposant que nous avons seulement deux points extrêmes sur le graphique :

$$\ln N = \ln N_0 - kt \quad (1)$$

car l'adjonction des points intermédiaires ne fait qu'améliorer la précision. Il s'agit de savoir quand nous avons commis dans nos déterminations une erreur relative $\Delta N/N$ sur N ; une erreur relative $\Delta N_0/N_0$ sur N_0 et une erreur relative $\Delta t/t$ sur t , et que nous tirons de ces données la valeur de k , quelle est l'erreur relative maxima qui peut être commise sur k .

On tire de (1)

$$\Delta N/N = \Delta N_0/N_0 - t \Delta k - k \Delta t$$

d'où

$$\Delta k/k = \frac{\Delta N_0/N_0 - \Delta N/N}{kt} - \Delta t/t$$

et finalement

$$\Delta k/k = \frac{\Delta N_0/N_0 + \Delta N/N}{\ln(N_0/N)} + \Delta t/t$$

Dans nos expériences, $\Delta t/t$ est négligeable, car le chronomètre donne la précision de 1/5 de seconde et le plus petit intervalle de chauffage est de 120 secondes. D'autre part, d'après les expériences préliminaires, le rapport N_0/N varie de 2 à 1,6 et si l'on s'arrange de telle sorte que $\Delta N_0/N_0 = \Delta N/N = 0,05$ on obtient $\Delta k/k$ de l'ordre de 0,2.

2. Précision sur les valeurs de E. Après avoir obtenu l'erreur maximale sur k, nous faisons toujours les calculs en supposant qu'il n'y a que deux valeurs extrêmes de k, puisque l'adjonction des valeurs intermédiaires ne fait que diminuer la valeur de l'erreur à évaluer et qu'il s'agit de chercher la limite supérieure de cette valeur.

S'il n'y a que deux points sur le graphique : $\ln k = f(1/T)$, nous pouvons écrire :

$$\frac{\ln k_2 - \ln k_1}{T_2 - T_1} = \frac{E}{R T_1 T_2}$$

si T_1 et T_2 sont des valeurs assez rapprochées, comme elles le sont dans notre cas, on a :

$$\frac{\Delta(\ln k_2 - \ln k_1)}{\ln k_2 - \ln k_1} - \frac{\Delta(T_2 - T_1)}{T_2 - T_1} = \frac{\Delta E}{E} - \frac{\Delta T_2}{T_2} - \frac{\Delta T_1}{T_1}$$

En réarrangeant les termes et en changeant les signes négatifs en positifs, on a finalement :

$$\frac{\Delta E}{E} = \frac{\Delta T_2}{T_2} + \frac{\Delta T_1}{T_1} + \frac{\Delta k_2/k_2 + \Delta k_1/k_1}{\ln(k_2/k_1)} + \frac{\Delta T_2 + \Delta T_1}{T_2 - T_1}$$

Les termes $\Delta T_2/T_2$ et $\Delta T_1/T_1$ représentent l'erreur du thermomètre employé ; ils sont négligeables.

Les quantités ΔT_2 et ΔT_1 dans le terme $\frac{\Delta T_2 + \Delta T_1}{T_2 - T_1}$ représentent l'erreur de lecture du thermomètre régulateur. Celui-ci est gradué au 1/10 de degré, mais on peut apprécier le 1/20 de degré. D'autre part, $T_2 - T_1 = 6$ dans nos expériences, d'où le terme en question est égal à 1/60. Le rapport k_2/k_1 est de l'ordre de 30. Nous avons trouvé plus haut que $\Delta k_2/k_2 = \Delta k_1/k_1$ peut atteindre 0,2. On a donc :

$$\frac{\Delta E}{E} = \frac{\Delta k_2/k_2 + \Delta k_1/k_1}{\ln(k_2/k_1)} + \frac{\Delta T_2 + \Delta T_1}{T_2 - T_1} = 0,13$$

Il s'agit là, bien entendu, de la limite supérieure des erreurs, en réalité, comme on le verra dans le chapitre suivant, les écarts expérimentaux sur E sont bien inférieurs à 10 p. 100.

CHAPITRE IV

RESULTATS1. Constantes de vitesse.

Nous avons étudié trois sérums A_1O dont deux, n° 21.2.56 et n° 4.5.56, provenant d'un même individu, ont été prélevés à trois mois d'intervalle, et trois sérums du groupe O. Pour mieux mettre en évidence une différence éventuelle, un sérum du groupe A_1O n° 4.5.56 et un sérum du groupe O n° 22.1.57 ont été étudiés simultanément, c'est-à-dire que les points correspondants des deux séries de graphiques ont été déterminés le même jour, dans des circonstances expérimentales identiques. Dans ce qui va suivre, nous allons d'abord donner les valeurs des concentrations d'agglutinine correspondant à chaque durée de chauffage à une température donnée pour chacun de ces sérums.

Chaque N_4^* , exprimé en milliers d'hématies par mm^3 , est la moyenne algébrique des résultats de plusieurs déterminations, suivie de l'écart type autour de cette moyenne. Toutes les droites sont calculées par la méthode des moindres carrés.

La figure 3 donne un exemple de cinétique de dénaturation.

Les tableaux VII, VIII, IX, X, XI, XII, résument les résultats de N_4^* correspondant à chaque température et durée de chauffage, ainsi que la constante de vitesse pour chaque température.

TABLEAU VII

Sérum du groupe A₁O n° 20.9.55. N_4^* sérum non chauffé = $8.270.000 \pm 370.000$

Température en °C	Durée du chauffage en minutes	$N_4^* \times 10^{-3}$	$k \times 10^3 \text{ min}^{-1}$
58	50	6.580 ± 470	2,4
	120	6.090 ± 480	
	180	5.260 ± 70	
	240	4.490 ± 170	
60	15	6.930 ± 650	9,8
	30	6.160 ± 210	
	45	5.300 ± 370	
	60	4.520 ± 160	
62	6	7.200 ± 240	28
	12	6.080 ± 530	
	18	5.060 ± 420	
	24	4.150 ± 220	
64	2	7.170 ± 400	80
	4	6.000 ± 510	
	6	5.270 ± 200	
	8	4.310 ± 320	

TABLEAU VIII

Sérum du groupe A₁O n° 21.2.56 N_4^* sérum non chauffé = 6.400.000 $\pm$ 480.000

Température en °C	Durée de chauffage en minutes	$N_4^* \times 10^{-3}$	$k \times 10^3 \text{ min}^{-1}$
58	150	4.520 $\pm$ 480	2,5
	300	2.900 $\pm$ 360	
61	25	4.160 $\pm$ 220	16
	50	2.890 $\pm$ 180	
64	5	4.250 $\pm$ 470	80
	10	2.850 $\pm$ 310	

TABLEAU IX

Sérum du groupe A₁O n° 4.5.56 N_4^* sérum non chauffé = 7.800.000 $\pm$ 900.000

Température en °C	Durée du chauffage en minutes	$N_4^* \times 10^{-3}$	$k = 10^3 \text{ min}^{-1}$
58	150	5.900 $\pm$ 900	2,1
	300	4.290 $\pm$ 370	
60	30	6.320 $\pm$ 500	8,6
	60	4.850 $\pm$ 400	
62	12	5.620 $\pm$ 150	27
	24	4.010 $\pm$ 400	

TABLEAU X

Sérum du groupe O n° 9.7.56

 N_4^* sérum non chauffé = $9.800.000 \pm 780.000$

Température en °C	Durée du chauffage en minutes	$N_4^* \times 10^{-3}$	$k \times 10^3 \text{ min}^{-1}$
58	150	7.620 ± 620	1,6
	300	6.120 ± 460	
60	30	8.290 ± 540	6
	60	6.900 ± 500	
62	12	7.460 ± 610	20
	24	4.900 ± 560	
64	5	7.610 ± 640	60
	10	5.410 ± 230	

TABLEAU XI

Sérum du groupe O n° 12.10.56

 N_4^* sérum non chauffé = $8.640.000 \pm 690.000$

Température en °C	Durée du chauffage en minutes	$N_4^* \times 10^{-3}$	$k \times 10^3 \text{ min}^{-1}$
58	150	6.680 ± 430	1,8
	300	5.030 ± 560	
60	30	7.000 ± 400	7,3
	60	5.570 ± 650	
62	12	6.880 ± 480	20
	24	5.330 ± 280	
64	5	6.490 ± 490	57
	10	4.910 ± 330	

TABLEAU XII

Sérum du groupe O n° 22.1.57

 N_4^* sérum non chauffé = $7.470.000 \pm 520.000$

Température en °C	Durée du chauffage, en minutes	$N_4^* \times 10^{-3}$	$k \times 10^3 \text{ min}^{-1}$
58	150	6.090 ± 630	1,5
	300	4.780 ± 100	
60	30	6.170 ± 400	6
	60	5.380 ± 160	
62	12	6.100 ± 700	19
	24	4.600 ± 700	
64	5	6.040 ± 500	49
	10	4.560 ± 600	

TABLEAU XIII

Constantes de vitesse en $\text{min}^{-1} \times 10^3$

Température en °C	K_{A_1O}	k_{oo}	K_{A_1O} / k_{oo}
58	$2,3 \pm 0,26$	$1,63 \pm 0,15$	1,41
60	9,2	$6,95 \pm 1,2$	1,33
62	27,5	20	1,38
64	80	55	1,45

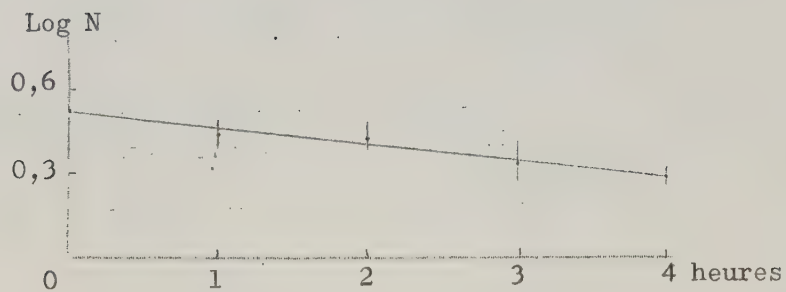


Figure 3.

Cinétique de dénaturation effectuée à 58°C d'une isohémagglutinine $\beta(A_1O)$ (30).

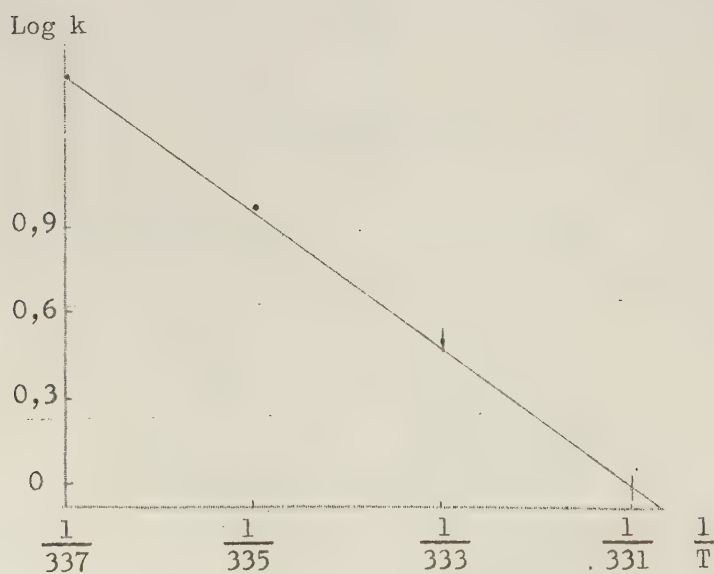


Figure 4.

Variation de $\log k$ en fonction de $\frac{1}{T}$
concernant une isohémagglutinine $\beta(A_1O)$ (30).

Le tableau XIII présente les moyennes des constantes de vitesse de dénaturation des isohémagglutinines $\beta(A_1O)$ et $\beta(OO)$ ainsi que le rapport de ces constantes pour chaque température étudiée.

Les différences entre les constantes de vitesse de $\beta(A_1O)$ et de $\beta(OO)$ sont nettement significatives comme le montre le test de Student pratiqué sur les mesures à 58°C, la probabilité pour que la valeur du rapport trouvé soit atteinte par hasard étant de 5 p.100.

2. Données énergétiques.

a) Energie d'activation expérimentale.

La figure 4 donne un exemple des graphiques $\ln k$ en fonction de $1/T$ ayant servi à la détermination de l'énergie d'activation expérimentale E.

Les valeurs de E obtenues en cal/mol sont indiquées dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

$\beta(A_1O)$			$\beta(OO)$		
20-9-55	21-2-56	4-5-56	9-7-56	12-10-56	22-1-57
128.000	116.000	125.000	133.000	125.000	128.000

b) Energie libre et enthalpie d'activation.

D'après la théorie des vitesses absolues la constante de vitesse de dénaturation est reliée aux variations d'énergie libre, d'enthalpie et d'entropie ΔF^* , ΔH^* et ΔS^* , correspondant au passage à l'état activé par les relations

$$\ln k = - \frac{\Delta F^*}{RT} = \ln \frac{\bar{K}T}{h} - \frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R}$$

$$E = \Delta H^* + RT$$

où $\bar{K}$ est la constante de Boltzmann, h la constante de Planck. On a :

$$\bar{K} = 1,3805 \times 10^{-16} \text{ erg deg}^{-1}$$

$$h = 6,624 \times 10^{-27} \text{ g cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

$$R = 8,3144 \text{ J deg}^{-1} \text{ mole}^{-1}$$

$$= 1,987 \text{ cal deg}^{-1} \text{ mole}^{-1}$$

Le tableau XV donne les valeurs calculées d'après les mesures à 58°C.

TABLEAU XV

$\beta(A_1O)$	ΔF^*	ΔH^*	ΔS^*	$\beta(00)$	ΔF^*	ΔH^*	ΔS^*
20.9.55	26.100	128.000	305	9.7.56	26.400	133.000	318
21.2.56	26.100	116.000	269	12.10.56	26.300	125.000	295
4.5.56	26.200	125.000	296	22.1.57	26.400	128.000	303
Moyenne	26 100 ± 100	123.000 ± 7.000	290 ± 15		26.400 ± 100	129.000 ± 4.000	305 ± 12

CHAPITRE V

DISCUSSION

Nous avons montré dans le chapitre précédent : 1° que la constante de vitesse de dénaturation de $\beta(00)$ est inférieure de 35 à 45 p.100 à celle de $\beta(A_1O)$; 2° que les énergies d'activation et les entropies d'activation sont sensiblement égales pour les deux isohémagglutinines.

Avant d'envisager la signification de ces résultats, nous montrerons qu'ils sont tout à fait cohérents avec ce que l'on sait de la thermodénaturation des protéines en général et des enzymes en particulier.

Certains auteurs comme Rapkine, Shugar et Siminovitch (23) ont manifesté quelques doutes sur le parallélisme de mécanisme entre le cas des enzymes et celui des autres protéines. Ils notaient que les variations de E et ΔS avec le pH sont très marquées dans le cas de l'inactivation thermique des enzymes alors que dans le cas de la dénaturation par la chaleur de l'ovalbumine (24) et de l'oxyhémoglobine (25), E et

ΔS restent pratiquement constants dans toute l'échelle de pH étudiée. Ceci était dû, comme du reste l'avaient pensé ces mêmes auteurs, à l'absence de données plus complètes. En effet, les mesures plus récentes de Northrop et ses collaborateurs (26) plaident nettement en faveur du parallélisme. Ces auteurs, étudiant certaines protéinases cristallisées comme la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine, ont trouvé que leur

inactivation thermique, mesurée par la perte d'activité enzymatique, est exactement parallèle à la dénaturation par la chaleur de ces mêmes protéines, à en juger par la diminution de la solubilité de ces substances. Nous avons réuni dans le tableau XVI les données trouvées dans la littérature.

TABLEAU XVI

Tableau des données énergétiques intéressant la thermodénaturation de différentes protéines, principalement des enzymes.

Substances	Temp. °C	pH	P.M.	ΔH^* ou E Kcal/mol.	ΔS^* u. entrop.	ΔF^* Kcal/mol
Insuline (27)	80	1,5	$4 \cdot 10^4$	35,6	23,8	27,2
Trypsine (28)	50-60	6,5	$3,6 \cdot 10^4$	40	44,7	25,7
Emulsine (27)	60	-	-	45	65,3	23,2
Solanaine (29)	60	7,0	-	61,3	109	25,1
Hémoglobine (25)	60,5	5,7	$6,7 \cdot 10^4$	75,6	153	24,7
dans l'eau (31)		6,8		76,3	152	24,5
dans $3N (NH_4)_2SO_4$ (31)		6,76		119,8	275,8	25,2
Leucosine (27)	55	6,1	-	84,3	185	23,6
Vibriolysine (27)	50	-	-	128	326	22,7
Tétanolysine (27)	50	-	-	172	459	24,6
Hémolysine de chèvre (32)	50	-	-	198	537	24,6
Entérokinase (33)	50-60	6,5	-	42,2	52,8	25,1
Trysinekinase (34)	-	6,5	-	44,3	57,6	26,2
Protéinase pancréatique (35)	-	6,9	-	37,9	40,6	24,7
Lipase pancréatique (36)	-	6	-	45,4	68,2	24

Substances	Temp. °C	pH	P.M.	ΔH^* ou E Kcal/mol.	ΔS^* u. entrop.	ΔF^* Kcal/mol
Amylase de malt (27)	-	-	-	41,6	52,3	-
Pepsine (31)	-	6,4	$36-39 \cdot 10^3$	55,6	113,4	21,9
	-	5,7		67,5	135,9	-
Peroxydase de lait (27)	-	-	-	185,3	466,4	-
Rennine (31)	-	-	-	89,3	208,1	22,1
Hémocyanine de homard (37)	-	-	-	81	175	20,7
Uréase (chaleur sèche) (38)	-	-	$48 \cdot 10^4$	20,8	-22	27,9
Inhib. de soja (39)	50	4,5	-	55,4	95,4	24,6
β -Lactoglobuline (40)	64-74	$\begin{cases} 6,6- \\ 6,9 \end{cases}$	-	79,9	158	26,0
Catalase (41)	-	7	$25 \cdot 10^4$	87	191	-
Lysozyme (42)	60-90	7,9	$14-17 \cdot 500$	42	-	-
Myosine (43)	35	7	10^6	70	150	22,7
Virus de la mos. du tabac (44)	-	-	$4 \cdot 10^7$	153	370	-
id. perte d'infectivité en solution	-	-		40	18	-
sec (44)	-	-		27	0	-
Sérumalbumine hum. (45)	65	6,8	$7 \cdot 10^4$	87,4	191	24,7
Ovalbumine (24)	25	1,35	$34-46 \cdot 10^3$	35,2	37,5	24
		3,4		96,8	-	-
(31)	65	5,0		132,0	316	25,4
		7,7		134	-	-
Invertase de la levure (31)	50	4,0		110,4	263	25,5
		5,2		86,0	185	25,7
		5,7		52,0	85	25,0
Phosphatase de l'ac. prostatique (0,18 M acétate) (46)	56,4	5		90	225	17,3
Ricine (22)	-	-	-	89,3	168,5	34,8
Luciférase (47)	-	6,8	$2 \cdot 10^4$	57	118	-

Substances	Temp. °C	pH	P.M.	ΔH^* ou E Kcal/mol.	ΔS^* u. entrop.	ΔF^* Kcal/mol
Amylase pancréa- tique (48)	-	6,5	-	39	-	-
Catalase du muscle (49)	-	7	-	10	-	-
Catalase du boeuf (50)	-	-	-	45	-	-
Catalase rénale (51)	-	7	-	40	-	-
Papaïne (29)	75-80	7	-	75	-	-
Asclépaïne m. (29)	60-65	7	-	76	-	-
Asclépaïne (29)	60-65	7	-	25	-	-
Bromdine (29)	60-65	7	-	46	-	-
Moldkinase (52)	-	4,8	-	53,5	-	-
Phosphomonoestérase de l'ac. salivaire de la parotide hum. (53)	-	4,57	-	88,3	-	-
T ₁ phage (en sol. (44))	-	-	-	165	372	-
T ₁ phage (sèche (44))	-	-	-	56,5	57	-
Désoxyribonucléase chaleur sèche (54)	-	-	62.10 ³	16	-37	-
Triosephosphate dés- hydrogénase (23)						
dans tampon acétate	60	4,5	-	35,6	41,6	21,5
phosphat.	60	5,6	-	89,8	200,5	22,3
citrate	60	5,6	-	79,7	171,1	22,2
phosphate	60	6,6	-	90,7	204	22,1
phosphate	60	7,8	-	87,6	195,5	22,0
pyrophosp.	60	8,6	-	66,8	135,1	21,3
borate	60	9,6	-	59,5	116	20,5
Dialyse sans tampon	58	5,6	-	78,1	185,5	22,4

Une première constatation résultant de ce tableau d'ensemble est la proportionnalité entre les valeurs de ΔH^* et celles de ΔS^* qui, se compensant, donnent à l'énergie libre d'activation une valeur sensiblement constante (Glasstone, Laidler et Eyring p.444 (31)).

Sur le graphique (fig.5) on a porté en abscisses les valeurs de ΔS^* et en ordonnées celles de ΔH^* . Il est clair que si la pente b de la droite

$$\Delta H^* = a + b \Delta S^* \quad (1)$$

est égale à la température absolue, l'énergie libre d'activation ΔF^* est une constante a et par conséquent à cette température toutes les vitesses de dénaturation sont égales. C'est pourquoi le paramètre b qui a les dimensions d'une température est appelé température isocinétique par Leffler (55). Cet auteur a trouvé la relation (1) valable pour de nombreuses réactions en chimie organique.

La pente correspondant au graphique a bien la valeur $b = 328$, c'est-à-dire la température absolue correspondant à 55°C , donc très voisine de la température à laquelle ont été faites la plupart des mesures.

Si l'on veut se faire une image, on peut admettre que la constante a , appelée ΔH_0 par Leffler, correspond à l'énergie d'environ 5 liaisons qui doivent au minimum être rompues pour que certains degrés de liberté nouveaux puissent apparaître. La rupture de toute autre liaison supplémentaire s'accompagne en moyenne d'un égal accroissement d'entropie. Il s'agit bien d'une valeur moyenne puisque des types bien différents de liaison sont impliqués dans le processus d'activation. On sait par exemple combien la vitesse de dénaturation est liée à l'état de dissociation de la molécule (Steinhardt (56), Neurath (57), Lanffer et Price (58)).

Quoi qu'il en soit on voit que les deux isohémagglutinines que nous avons étudiées et qui sont marquées par des croix sur le graphique de la figure 5 se placent d'une manière tout-à-fait satisfaisante sur la droite représentant ΔH^* en fonction de ΔS^* .

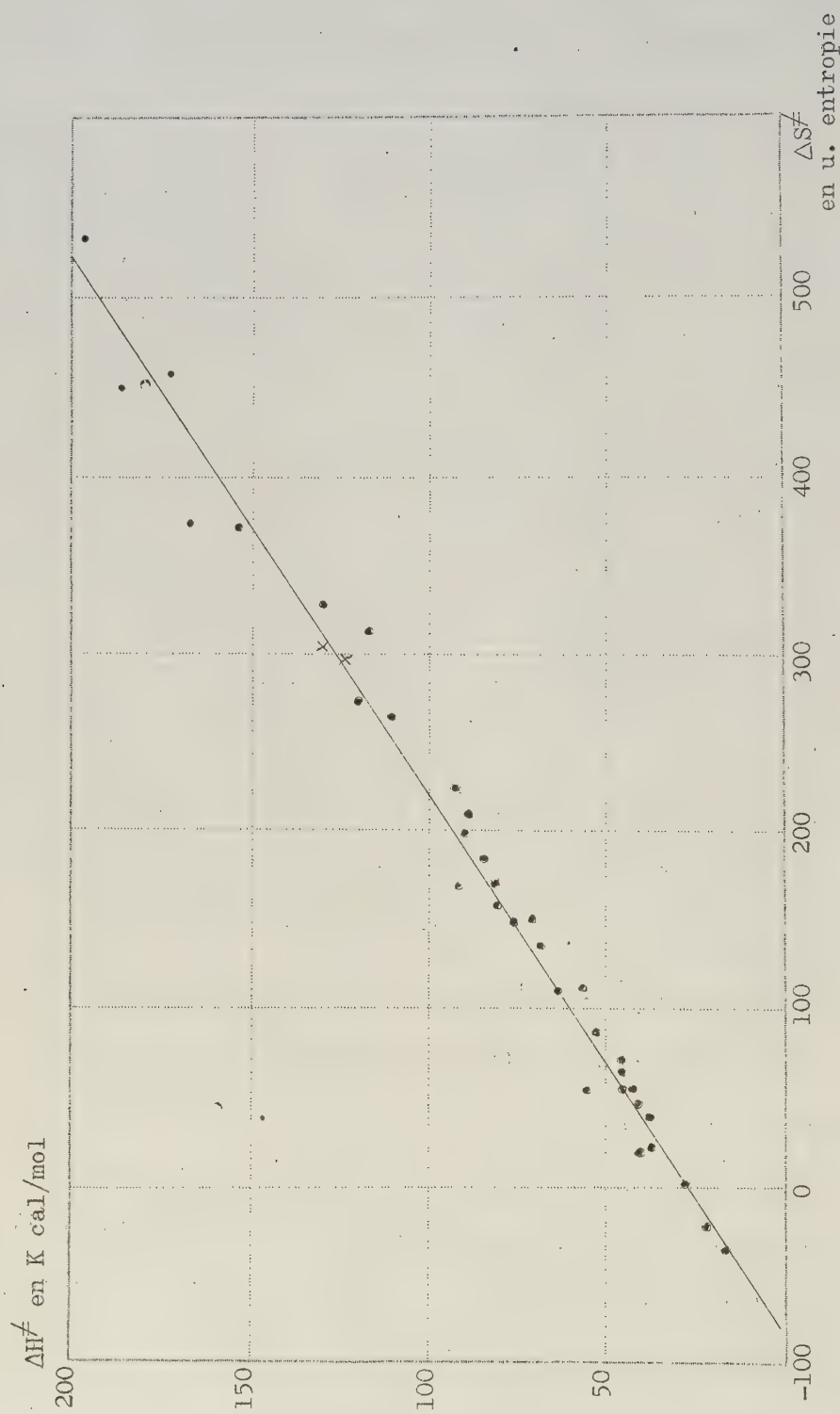


Figure 5.

Graphique montrant la variation de $\Delta H^\ddagger$ en fonction de $\Delta S^\ddagger$ du processus de la thermodénaturation de différentes protéines, principalement des enzymes.

Nous sommes ainsi conduits à interpréter les données concernant ces isohémagglutinines d'après les idées admises sur la dénaturation des protéines en général.

Nous devons tout d'abord rechercher s'il a été trouvé jusqu'ici une relation entre les énergies d'activation et les dimensions moléculaires.

Il aurait été intéressant de rechercher une telle relation dans le tableau. Mais, comme on le sait, l'énergie d'activation d'une dénaturation varie avec les températures et le pH du milieu dans lequel a lieu la réaction. Si l'influence de la température n'est pas très grande dans l'échelle de température usuelle, on ne peut par contre comparer deux valeurs de E et de ΔH^* à deux pH différents. De plus, beaucoup d'auteurs n'ont pas indiqué le pH, et le poids moléculaire de beaucoup de substances étudiées est inconnu. Néanmoins, il est fort peu probable que les dimensions moléculaires aient quelque chose à voir avec la valeur de l'énergie d'activation. C'est ainsi qu'en négligeant les variations résultant de la différence de température, nous relevons que la catalase de poids moléculaire 250.000 a pour E 87.000 cal/mol et la myosine de poids moléculaire 1.000.000 a pour E 70.000 cal/mol seulement, les deux réactions ayant lieu à pH 7. La valeur de leur ΔS^* est respectivement 191 et 150 u.e. Un autre exemple : la pepsine de poids moléculaire 39.000 se dénature avec E et ΔS^* respectivement 55.600 cal/mol et 113,3 u.e. à pH 6,4 et la trypsine de poids moléculaire 36.000 se dénature avec E et ΔS^* respectivement 40.000 cal/mol et 44,7 u.e. à pH 6,5. Si les deux valeurs de E ne sont pas très différentes, les deux valeurs de ΔS^* sont dans le rapport de 1 à 2,5.

Ainsi l'absence de différence entre les énergies d'activation de la

dénaturation des isohémagglutinines $\beta(A_1O)$ et $\beta(OO)$ de dimensions si différentes ne soulève pas de question nouvelle. On conçoit d'ailleurs assez bien cette indépendance des dimensions si l'on considère la structure admise pour les protéines globulaires. Stearn (13) a montré dans le cas de la trypsine que l'activation porte sur une fraction des liaisons qui sont finalement rompues. On peut penser avec Klotz (17) que la dénaturation d'une protéine consiste dans un déroulement partiel des deux bouts de l'hélice protéinique. Dans cette dernière image en effet, puisque le bout partiel déroulé peut être de longueur quelconque, les énergies d'activation de deux protéines de poids moléculaire différent peuvent être soit égales soit différentes.

Cette même image permet de comprendre les différences de vitesse de dénaturation qui ont été observées entre $\beta(A_1O)$ et $\beta(OO)$. En effet cette vitesse doit être d'autant plus grande qu'il existe plus de bouts de chaîne dans la molécule, ce qui doit être le cas pour $\beta(A_1O)$ relativement à $\beta(OO)$. Mais il n'y a aucune raison pour qu'existe une proportionnalité entre le nombre de bouts de chaînes et les dimensions moléculaires.

D'autre part il faut s'attendre à ce que l'énergie d'activation qui dépend de la nature des liaisons rompues à ces bouts de chaînes soit la même pour les deux isohémagglutinines.

Notons enfin qu'étant donné l'incertitude pesant sur la détermination des énergies d'activation, 6 p. 100, soit environ 5.000 calories, l'inégalité des vitesses est trop faible pour que l'on ait trouvé une différence significative dans les variations d'énergie libre d'activation.

CONCLUSIONS

En employant la méthode de dosage d'agglutinine de S. Filitti-Wurmser et Y. Jacquot-Armand, nous avons déterminé la vitesse de dénaturation et les données thermodynamiques intéressant l'activation de la dénaturation par la chaleur de deux des isohémagglutinines du groupe anti-B : $\beta(A_1O)$ et $\beta(OO)$.

1° On a trouvé une différence de vitesse de dénaturation significative entre les deux isohémagglutinines. Les rapports mesurés de k_{A_1O} à k_{OO} sont 1,41 à 58°C, 1,33 à 60°C, 1,38 à 62°C et 1,45 à 64°C.

2° Les données énergétiques sont les suivantes :

	$E \sim \Delta H^*$ (cal/mol)	ΔS^* (cal/mol/deg)	ΔF^* (cal/mol)
$\beta(A_1O)$	123.000 ± 7.000	290 ± 15	26.100 ± 100
$\beta(OO)$	129.000 ± 4.000	305 ± 12	26.400 ± 100

3° Ces résultats ont été interprétés en se basant sur les notions généralement admises relatives au mécanisme de dénaturation des protéines. Les deux isohémagglutinines $\beta(A_1O)$ et $\beta(OO)$ ont des dimensions moléculaires très différentes d'après leur vitesse de sédimentation. On conçoit que $\beta(A_1O)$ renferme un plus grand nombre de bouts de chaînes polypeptidiques que $\beta(OO)$. Si donc l'activation de la dénaturation consiste dans la rupture de liaisons à ces bouts de chaîne, la vitesse de dénaturation de $\beta(A_1O)$ doit être supérieure à celle de $\beta(OO)$.

Les valeurs très voisines de l'énergie d'activation trouvées pour les deux isohémagglutinines correspondent vraisemblablement à une similitude dans la configuration des bouts de chaîne.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kabat E.A., Blood Group Substances (1956) Acad. Press Inc. Publishers
N.Y. p. 43.
2. Filitti-Wurmser S et Jacquot-Armand Y., Arch. Sc. Physiol.
(1947) 1, 151.
3. Jacquot-Armand Y. et Filitti-Wurmser S., Arch. Sc. Physiol.
(1953) 7, 233.
4. Wurmser R. et Filitti-Wurmser S., Biochim. Biophys. Acta (1950) 4, 238.
5. Filitti-Wurmser S., Jacquot-Armand Y. et Wurmser R., J. Chim.
Phys. (1950) 47, 419.
6. Jacquot-Armand Y. et Filitti-Wurmser S., C.R. Soc. Biol. (1952) 146, 391.
7. Filitti-Wurmser S., Jacquot-Armand Y. et Wurmser R. J. Chim. Phys.
(1952) 49, 550.
8. Filitti-Wurmser S., Aubel-Lesure G. et Wurmser R., J. Chim. Phys.
(1953) 50, 236.
9. Filitti-Wurmser S., Jacquot-Armand Y. et Wurmser R., J. Chim. Phys.
(1953) 50, 240.
10. Filitti-Wurmser S., Aubel-Lesure G. et Wurmser R., J. Chim. Phys.
(1953) 50, 317.
11. Wurmser R., Filitti-Wurmser S. et Jacquot-Armand Y., Dos Annais da
Acad Bras. Cienc. (1954) 26, 193.
12. Filitti-Wurmser S., Jacquot-Armand Y., Aubel-Lesure G. et Wurmser R.
Anal. Eugenics (1954) 18, 183.
13. Stearn E., Ergebnisse d. Enzymforsch. (1938) 7, 1.
14. Mirsky A.E. et Pauling L., Proc. Natl. Acad. Sc. U.S. (1936) 22, 439.
15. Pauling L., Corey R.B. et Branson H.R., Proc. Natl. Sc. U.S.
(1951) 37, 205.

16. Schelleman J.A., C.R. Trav. Lab. Carlsberg, sér.chim. (1955), 29, 223.
17. Klotz M.I., Energetics in Biochemical Reactions, Acad. Press. Inc.
Pub. N.Y. 1957.
18. Mavrides S., Thèse de Doctorat ès-Sciences, Paris (1955).
19. Wurmser R., Filitti-Wurmser S. et Briault R., Rev. Canad. Biol.
(1942), 1, 372.
20. Irwing I.O., Armitage P. et Davis C.N., Nature (1949) 163, 809.
21. Le Comte du Nouÿ. La Température Critique du Sérum. Hermann,
Paris (1936).
22. Rohrer F., Schweiz. Med. Wochenschr. (1922) 52, 555.
23. Rapkine L., Shugar D. et Siminovitch L., J. Chim. Phys. (1949) 46, 642.
24. Lewis P.S., Biochem. J. (1926) 20, 978.
25. Lewis P.S., Biochem. J. (1926) 20, 965.
26. Northrop J.H., Crystalline Enzymes. Columbia Univ. Press N.Y.
27. Eyring H. et Stearn A.E., Chem. Rev. (1939) 25, 253.
28. Pace J. Biochem. J. (1930) 24, 606.
29. Greenberg D.M. et Winnick J. J. Biol. Chem. (1940) 135, 781.
30. Sung S.S. Compt. rend. (1956) 243, 100.
31. Glasstone S., Laidler K.J. et Eyring H., The Theory of Rate Process,
Mc Graw-Hill, N.Y. (1941).
32. Fämuléner L.W. et Madsen T., Biochem. J. (1908) 11, 186.
33. Pace J., Biochem. J. (1931) 25, 1.
34. Pace J., Biochem. J. (1931) 25, 442.
35. Pace J., Biochem. J. (1931) 25, 1485.
36. McGillivray, I.H., Biochem. J. (1930) 24, 891.
37. Fleisher J.H., Biochim. Biophys. Acta (1957) 23, n°1, 28.
38. Setlow J., Arch. Biochem. Biophys. (1952) 36, 328.

39. Kunitz M., J. Gen. Physiol. (1948) 32, 241.
 40. Larson B.L. et Jenness R., J. Am. Chem. Soc. (1951) 74, 3090.
 41. Guild et Van Tubergen, Science (1957), 125, 937.
 42. Gorini L. et Felix F., Biochim. Biophys. Acta (1953) 10, 128.
 43. Ouellet K.J., Laidler K.J. et Morale M.F., Arch. Biochem. Biophys.
(1952), 39, 37.
 44. Pollard E. et Setlow J., Arch. Biochem. Biophys. (1953) 43, 136.
 45. Gibbs R.J., Arch. Biochem. Biophys. (1954) 51, 277.
 46. London M., Wigler P. et Hudson P.B., Arch. Biochem. Biophys.
(1954) 52, 236.
 47. Eyring H. et Mager J.L., J. Cell. Comp. Physiol. (1942) 20, 151.
 48. Giri K.V., J. Indian Inst. Sci. (1932) 15 A, 117.
 49. Marks G.W. et Fox D.C., J. Biol. Chem. (1933) 103, 269.
 50. Oppenheimer C., Die Fermente (1924) vol. I, Thieme, Leipzig.
 51. Morgulis S., Beber M. et Robkind I., J. Biol. Chem. (1926) 68, 521.
 52. Kunitz M., J. Gen. Physiol. (1938) 21, 601.
 53. Lionetti F.J., Chauncey H.H. et Lisanti V.F., Biochim. Biophys. Acta
(1957) 24, 496.
 54. Smith C.L., Arch. Biochem. Biophys. (1953) 45, 83.
 55. Leffler J.E., J. Org. Chem. (1955) 20, 1202.
 56. Steinhardt J., Kgl. Danske Videnskabs Selskab Math. Fys. Medd.
(1937) 14, n° 11.
 57. Neurath H.N., Greenstein J.P., Putnam F.W. et Erickson J.O.,
Chem. Rev. (1944) 34, 157.
 58. Lauffer M.A. et Price W.C., J. Biol. Chem. (1940) 133, 1.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE PREMIER : <u>La technique de dosage des agglutinines par</u> <u>numération globulaire</u>	8
I. Généralités	8
a) Durée de la mise en équilibre.....	11
b) Détermination du palier de la courbe de référence	11
II. Techniques	12
a) Préparation du matériel biologique	12
(1) Sérum	12
(2) Hématies	12
b) Conduite d'un dosage d'agglutinine	13
(1) Préparation	13
(2) Numération	14
(3) Correction des agglutinats de coïncidence	15
c) Exemple numérique	19
III. Discussion sur la précision	21
a) Causes d'erreurs provenant des hématies	21
b) Causes d'erreurs d'origine opérationnelle	21
c) Causes d'erreurs d'origine statistique	24
CHAPITRE II : <u>Caractérisation des isohémagglutinines</u>	26
CHAPITRE III : <u>Etude cinétique de la thermodénaturation</u> <u>des isohémagglutinines</u>	31
a) Choix des températures et des durées de chauffage	31
b) Conditions expérimentales	33
c) Précision escomptée des résultats	34
(1) Précision sur les valeurs de k	34
(2) Précision sur les valeurs de E	35

CHAPITRE IV : <u>Résultats</u>	37
1. Constantes de vitesse	37
2. Données énergétiques	43
a) Energie d'activation expérimentale	43
b) Energie libre et enthalpie d'acti- vation	43
CHAPITRE V : <u>Discussion</u>	45
CONCLUSIONS	53
BIBLIOGRAPHIE	54

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"STRUCTURE CHIMIQUE DE L'INSULINE"

Vu et approuvé :

Paris, le 6 Janvier 1958.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J. PERES

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris

Jean SARRAILH

